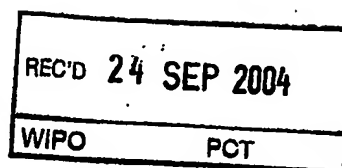


FR 04/1467



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

### BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>11 JUIN 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0306992</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>11 JUIN 2003</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b> 54, rue Saint-Lazare F-75009 Paris	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>IFB 03 AQ CNR AZA3</b>			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date   / /	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date   / /	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date   / /	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)  ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU AZA- $\beta^3$ -AMINOACYCLE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THÉRAPIE			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date   / /   Pays ou organisation _____ N° _____ Date   / /   Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		<b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		. . . . .	
Code APE-NAF		. . .	
Adresse	Rue	<b>3, rue Michel-Ange</b>	
	Code postal et ville		
Pays	<b>F-75794 PARIS CEDEX 16</b>		
Nationalité	<b>FRANCE</b>		
N° de téléphone (facultatif)	<b>FRANCAISE</b>		
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>11 JUIN 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0306992</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		<b>IFB 03 AQ CNR AZA3</b>
<b>6 MANDATAIRE</b>		
Nom		<b>DEMACHY</b>
Prénom		<b>Charles</b>
Cabinet ou Société		<b>GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b>
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	<b>54, rue Saint-Lazare</b>
	Code postal et ville	<b>75009 PARIS</b>
N° de téléphone (facultatif)		<b>01.42.81.09.58</b>
N° de télécopie (facultatif)		<b>01.42.81.08.71</b>
Adresse électronique (facultatif)		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		<b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b>
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> Charles DEMACHY (Nom et qualité du signataire) Mandataire 422.5/PP.170		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>

# ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU AZA- $\beta^3$ -AMINOACYLE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THERAPIE

5

La présente invention a pour objet des analogues de peptides ou protéines parents, ces analogues peptidiques, comprenant au moins un résidu aza- $\beta^3$  aminoacyle, ainsi que leurs utilisations dans des compositions pharmaceutiques ou pour le diagnostic de pathologies dans lesquelles sont impliqués les peptides ou protéines parents susmentionnés.

10

L'identification des régions antigéniques (ou épitopes) reconnues par les cellules T et la compréhension des bases moléculaires et cellulaires de la reconnaissance antigéniques sont considérées comme des étapes clés dans la conception et le développement de stratégies vaccinales et d'immunomodulation. L'immunisation à l'aide de peptides correspondant à des épitopes du non-soi (par exemple viraux, bactériens) ou du soi (par exemple tumoraux) pour induire des anticorps et/ou des lymphocytes T auxiliaires (Th) ou des lymphocytes cytotoxiques (CTL) spécifiques de la tumeur ou du virus, est aujourd'hui une stratégie particulièrement prometteuse dans le développement de vaccins synthétiques. Dans le cas des vaccins antiviraux par exemple, les peptides présentent plusieurs avantages majeurs sur les préparations traditionnelles de virus atténués ou inactivés, à savoir une production plus simple, chimiquement définie et parfaitement contrôlable, ainsi qu'une meilleure stabilité à température ambiante. Des approches thérapeutiques basées sur des épitopes T CD4<sup>+</sup> d'antigènes du soi sont aussi proposées.

15

20

25

En pratique, cependant, les peptides se révèlent souvent peu immunogènes et ne permettent pas d'obtenir des titres élevés d'anticorps capables de réagir avec la protéine native ou la particule virale. Ces limitations à l'utilisation des peptides dans le développement de vaccins synthétiques sont probablement liées à une biodégradabilité importante dans les fluides biologiques, une mauvaise diffusion à travers les systèmes membranaires et par le manque de sélectivité vis-à-vis de la cible.

30

Différentes approches ont été développées pour "transformer" les peptides en molécules capables d'induire une réponse immune humorale ou cellulaire plus forte et plus spécifique. L'introduction dans des peptides antigéniques de liaisons pseudo-peptidiques est une stratégie des plus intéressantes pour améliorer leurs

caractéristiques physico-chimiques propres et leur aptitude à interagir avec les effecteurs du système immunitaire. Malgré les applications potentielles importantes dans le domaine du diagnostic, de la vaccination ou de l'immunomodulation, et l'étendue des connaissances de ces analogues acquises dans des domaines chimique et pharmacologique, les pseudopeptides sont encore peu utilisés en immunologie.

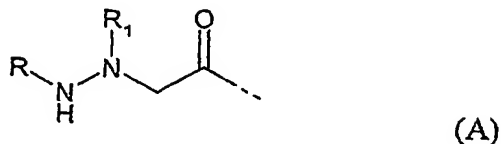
La présente invention a pour but de fournir des analogues peptidiques résistants aux enzymes de dégradation, et capables de mimer l'activité de divers peptides natifs, agents de vaccination ou d'immunomodulation.

L'invention a plus particulièrement pour but de fournir des analogues peptidiques qui se caractérisent par l'introduction de monomères, ne présentant pas de centre chiraux carbonés, ce qui permet de s'affranchir des difficultés liées à la synthèse asymétrique et aux problèmes d'épimérisation. Cette famille d'analogues peptidiques constitue une nouvelle classe de peptidomimétiques, dans lesquels les résidus (chaînes latérales) sont portés par des atomes d'azote chiraux à configuration non fixée, ce qui leur confère une grande adaptabilité spatiale. Le positionnement correct des peptidomimétiques construits selon ce principe, dans un site enzymatique se produit à la fois par le déplacement d'équilibres conformationnel et configurationnel. L'action d'un tel composé, d'un point de vue stéréochimique, est équivalente à celle d'un mélange de diastéréoisomères en équilibre rapide, l'interaction avec le site enzymatique déplaçant l'équilibre vers le ou les stéréoisomères les plus affins. D'autres bénéfices potentiels peuvent également en résulter, tels que, d'un point de vue chimique, une simplification des méthodes de synthèse (suppression des problèmes stéréochimiques), et d'autre part, une plus grande résistance de tels analogues aux squelettes modifiés, vis-à-vis de l'action des peptidases. La synthèse préalable de ces monomères, autorise l'introduction d'une bonne diversité de chaînes latérales, aussi bien en série protéogénique que non protéogénique, et donc permet de moduler dans une certaine mesure, leur affinité et leur lipophilie.

L'invention a également pour but de fournir des compositions pharmaceutiques comprenant de tels analogues peptidiques, ainsi que des méthodes de diagnostic *in vitro* de pathologies impliquant les peptides parents dont sont issus ces analogues peptidiques, et des kits pour la mise en oeuvre de ces méthodes.

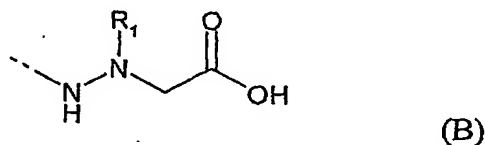
La présente invention a pour objet l'utilisation d'analogues de peptides ou protéines parents, ces analogues peptidiques, encore désignés peptides hybrides, comprenant au moins un résidu aza- $\beta^3$ -aminoacyle, à savoir :

- un résidu répondant à la formule (A) suivante lorsqu'il est situé en position N-terminale,



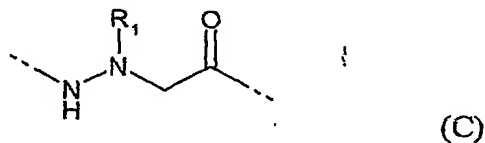
dans laquelle R représente H ou un groupe protecteur de la fonction amine des aminoacides, tels que Fmoc (fluorénylméthoxyloxycarbonyl), Boc (tert-butyloxycarbonyl), ou Z (benzyloxycarbonyl), et R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (B) suivante lorsqu'il est situé en position C-terminale,



dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (C) suivante lorsqu'il est situé dans la chaîne desdits peptides hybrides,



dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

pour la préparation:

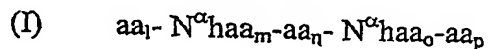
- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence, dans l'organisme d'un individu, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ou

- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T,

- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu d'un anticorps susceptible d'être reconnu par un susdit peptide hybride,

ou pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies susmentionnées.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides de formule (I) suivante :



dans laquelle :

-  $aa_1$ ,  $aa_n$  et  $aa_p$  représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

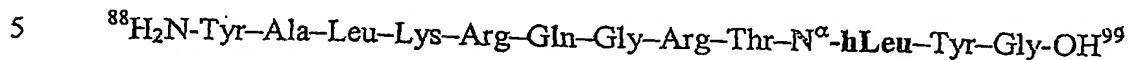
-  $N^{\alpha}haa_m$  et  $N^{\alpha}haa_o$  représentent un résidu monomère aza- $\beta^3$  aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées ci-dessus, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles  $R_1$  est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles,

-  $l$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ , et  $p$  représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de  $m$  ou de  $o$  soit différent de zéro, et que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4.

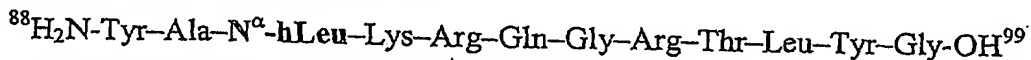
L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4 à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 1, dont l'un au moins des acides aminés initiaux est substitué par un résidu analogue aza- $\beta^3$  acide aminé, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement du lupus érythémateux disséminé.

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 défini ci-dessus, et ayant les formules suivantes :

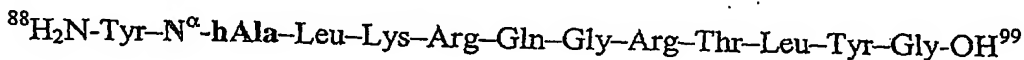
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



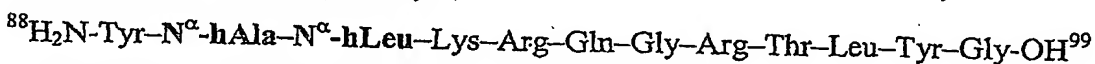
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



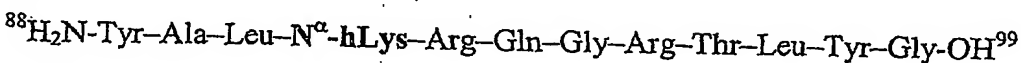
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



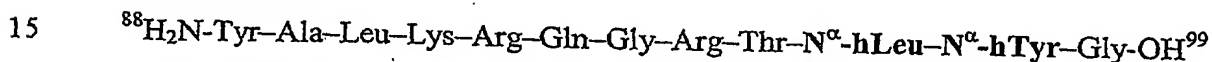
10 - SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



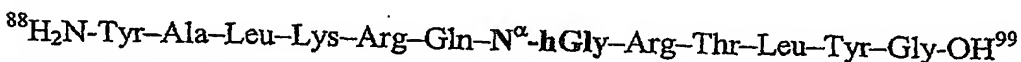
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



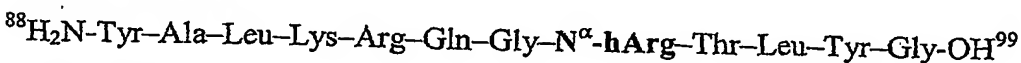
- SEQ ID NO : 7 :



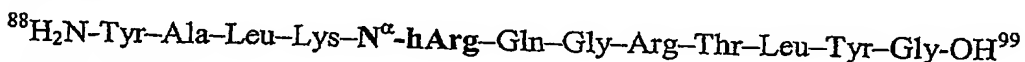
- SEQ ID NO : 8 :



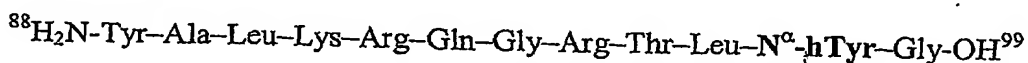
- SEQ ID NO : 9 :



20 - SEQ ID NO : 10 :



- SEQ ID NO : 11 :



25 L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 2.

L'invention a également pour objet les peptides hybrides comprenant au moins un aza- $\beta^3$  aminoacide, ces peptides hybrides étant des analogues de peptides ou protéines parents, lesdits peptides hybrides comprenant au moins un aminoacide initial du peptide ou de la protéine parent.

30 A ce titre l'invention concerne plus particulièrement les peptides hybrides définis ci-dessus de formule (I) suivante :



dans laquelle :



- aa<sub>1</sub>, aa<sub>n</sub> et aa<sub>p</sub> représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

5 - N<sup>α</sup>haa<sub>m</sub> et N<sup>α</sup>haa<sub>o</sub> représentent un résidu monomère aza-β<sup>3</sup> aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza-β<sup>3</sup> aminoacyles, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza-β<sup>3</sup> aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) mentionnées ci-dessus, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits  
10 peptides hybrides, et dans lesquelles R<sub>1</sub> est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza-β<sup>3</sup> aminoacyles,

- l, m, n, o, et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, que le nombre  
15 minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4, et l'un au moins de l, n, ou p soit différent de zéro.

L'invention a plus particulièrement pour objet les peptides hybrides susmentionnés de formules suivantes :

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):

20 <sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-N<sup>α</sup>-hLeu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):

<sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-Ala-N<sup>α</sup>-hLeu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):

<sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-N<sup>α</sup>-hAla-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

25 - SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):

<sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-N<sup>α</sup>-hAla-N<sup>α</sup>-hLeu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):

<sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-Ala-Leu-N<sup>α</sup>-hLys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

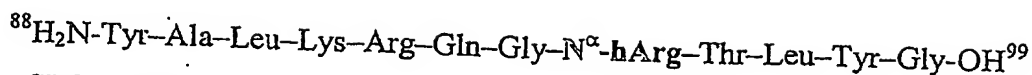
- SEQ ID NO : 7 :

30 <sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-N<sup>α</sup>-hLeu-N<sup>α</sup>-hTyr-Gly-OH<sup>99</sup>

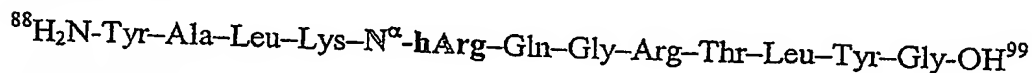
- SEQ ID NO : 8 :

<sup>88</sup>H<sub>2</sub>N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-N<sup>α</sup>-hGly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>

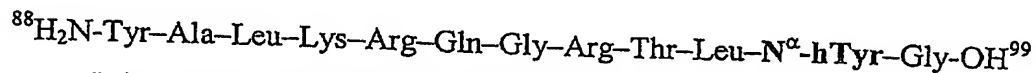
- SEQ ID NO : 9 :



- SEQ ID NO : 10 :

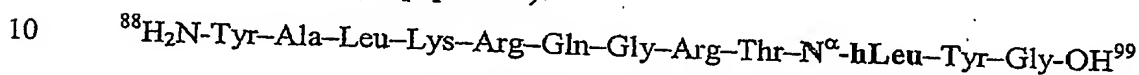


5 - SEQ ID NO : 11 :

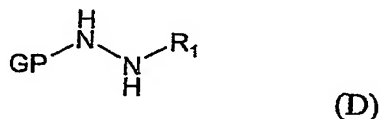


L'invention concerne plus particulièrement encore le peptide hybride tel que défini ci-dessus de formule suivante:

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



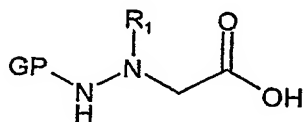
L'invention concerne également un procédé de préparation d'aza- $\beta^3$  aminoacides caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de l'hydrazine substituée et protégée de formule (D) suivante :



dans laquelle R représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides, le cas échéant protégée, et GP un groupe protecteur des fonctions amines, tels que Boc, Fmoc, ou Z,

20 avec de l'acide glyoxylique sous agitation en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  en milieu acide,

ce qui conduit en une étape au composé aza $\beta^3$  aminoacide de formule



dans laquelle R et GP sont tels que définis ci-dessus, ledit composé pouvant le cas échéant être déprotégé, notamment à l'aide de  $\text{HCl}$ , de pipéridine, ou d'hydrogène palladié, afin d'éliminer le groupe GP (Boc, Fmoc, ou Z) et le remplacer par H.

L'invention concerne plus particulièrement les aza- $\beta^3$  aminoacides suivants :

30 Fmoc aza- $\beta^3$ -Glycine (Fmoc- $\text{N}^\alpha\text{hGly-OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Lysine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hLys(Boc)-OH),

Fmoc -aza- $\beta^3$ -Aspartique acide (Fmoc-N $^{\alpha}$ hAsp(OtBu)-OH),

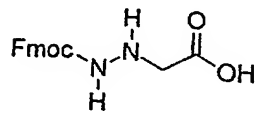
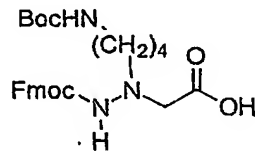
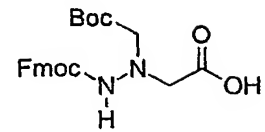
Fmoc aza- $\beta^3$ -Methionine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hMet-OH),

Fmoc aza- $\beta^3$  Arginine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hArg (Boc)-OH),

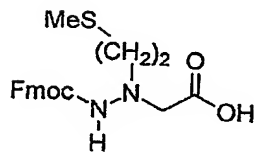
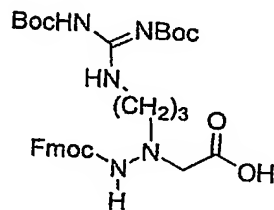
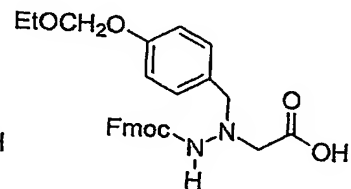
Fmoc aza- $\beta^3$ -Tyrosine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hTyr(OCH<sub>2</sub>OEt)-OH).

dont les formules sont respectivement les suivantes :

10

Fmoc-N $^{\alpha}$ hGly-OHFmoc-N $^{\alpha}$ hLys(Boc)-OHFmoc-N $^{\alpha}$ hAsp(t-Bu)-OH

15

Fmoc-N $^{\alpha}$ hMet-OHFmoc-N $^{\alpha}$ hArg(Boc)-OHFmoc-N $^{\alpha}$ hTyr(CH<sub>2</sub>OEt)-OH

20

L'invention concerne également les complexes entre un peptide hybride tel que défini ci-dessus, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe MHC-hybride), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe MHC-hybride-récepteur T).

L'invention concerne plus particulièrement un complexe entre un peptide hybride tel que défini ci-dessus, et un récepteur de cellules T.

L'invention a également pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur d'anticorps dirigé contre ladite protéine, avec un peptide hybride tel que défini ci-dessus, ledit peptide hybride étant issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou issu d'un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène, dans des conditions permettant la réaction entre les anticorps dirigés contre la protéine et susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique, et le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente ou

- la détection *in vitro* d'anticorps circulants chez le patient par un test de compétition en utilisant un anticorps anti-hybride.

L'invention a également pour objet un nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, comprenant:

- un peptide hybride issu de tout ou partie de la protéine endogène ou exogène, ou correspondant à un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène,

- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique,

- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, notamment les vaccins, comprenant au moins un peptide hybride tel que défini ci-dessus, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins un peptide hybride tel que défini ci-dessus, associé ou non à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique ou auxiliaire.

L'invention concerne également les anticorps anti-peptides hybrides polyclonaux ou monoclonaux tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au

moins un peptide hybride défini ci-dessus, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces peptides hybrides, et/ou avec les peptides ou protéines parents correspondant à ces derniers, et caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le peptide parent ou la protéine parente avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-peptide parent ou anti-protéine parente vis à vis du peptide parent ou de la protéine parente.

L'invention a plus particulièrement pour objet les anticorps anti-idiotypes susceptibles de former un complexe avec les anticorps susmentionnés, tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec lesdits anticorps.

L'invention concerne également une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur de ladite protéine, avec l'un au moins des anticorps susmentionnés, les anticorps étant avantageusement dirigés contre un peptide hybride issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou

dans des conditions permettant la réaction entre la protéine susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et les susdits anticorps dirigés contre le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente.

L'invention a également pour objet un nécessaire où kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, comprenant:

- des anticorps susmentionnés, dirigés contre ce peptide hybride;

- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, notamment les vaccins, comprenant au moins un anti-idiotype susmentionné, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins un anti-idiotype tel que défini ci-dessus, associé à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique.

10 L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, comprenant des anticorps tels que définis ci-dessus, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la synthèse d'aza- $\beta^3$  aminoacides, et de peptides hybrides les contenant, ainsi que de leur activité biologique.

15 La séquence sur laquelle les Inventeurs ont travaillé dans un premier temps est un peptide de l'histone H4 (résidus 88-99: YALKRQGR<sup>T</sup>LYG) qui représente un épitope T CD4<sup>+</sup> immunodominant minimum reconnu par des cellules Th ganglionnaires de souris immunisées contre du nucléosome, structure de base de la chromatine, formée d'ADN et des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Il a été  
20 démontré ces dernières années que le nucléosome joue un rôle primordial en tant qu'antigène et immunogène dans une maladie autoimmune systémique, le lupus érythémateux disséminé, qui touche aujourd'hui 1 million d'Américains. Ce peptide de la région C-terminale de l'histone H4 a l'importante propriété de ne pas être  
25 reconnu par des cellules Th générées contre la protéine H4 isolée, mais seulement par les cellules Th générées contre le nucléosome. Des études détaillées de ce peptide chez la souris normale BALB/c et à l'aide d'un modèle murin de lupus (souris NZBxNZW) ont permis d'obtenir des informations concernant la réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup> et B (production d'anticorps) dirigées contre ce peptide.

30 La synthèse de plusieurs analogues de ce peptide 88-99 de l'histone H4 a été réalisée en remplaçant avec succès différentes positions par leur analogue respectif N $\alpha$ haa, selon la méthodologie décrite ci-dessous.

### 1) Méthodologie de Synthèse

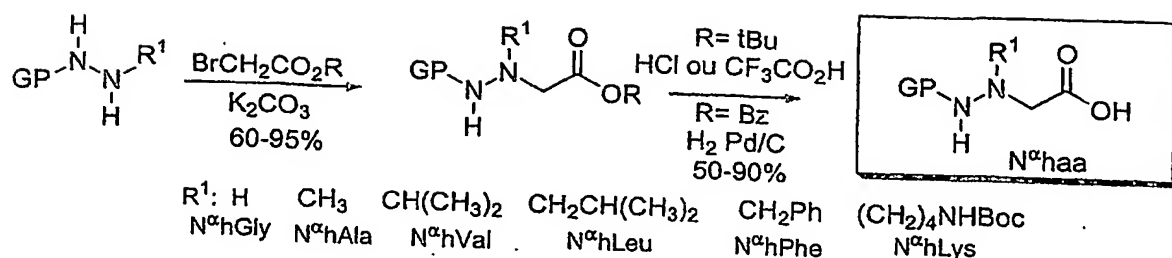
La synthèse décrite ci-après est celle d'aza- $\beta^3$  peptides ou peptides hybrides incluant un ou plusieurs monomères aza- $\beta^3$  amino acides, homologues azotés d'amino acides. Les chaînes latérales des monomères mimant les aminoacides sont portées par des atomes d'azote qui sont isoélectroniques des  $\text{CH}\alpha$ , (atomes d'azote chiraux à configuration non fixée), ce qui leur confère une grande liberté conformationnelle. De plus, ces monomères ne possèdent aucun centre d'asymétrie de configuration fixée. Le positionnement correct de la chaîne peptidique dans un site enzymatique se produit à la fois par le déplacement d'équilibres conformationnel et configurationnel. L'action d'un tel composé, d'un point de vue stéréochimique, est équivalente à celle d'un mélange de diastéréoisomères en équilibre rapide, l'interaction avec le site enzymatique déplaçant l'équilibre vers le plus affine.

La méthode de la présente invention permet d'introduire une grande variété de chaînes latérales, protéogéniques ou non protéogéniques, dans des positions choisies. D'autres bénéfices potentiels en résultent également tels qu'une simplification des méthodes de synthèse (suppression des problèmes stéréochimiques) et une plus grande résistance de tels analogues aux squelettes modifiés vis-à-vis de l'action des peptidases. Ceci permet d'une part de mimer la plupart des aminoacides naturels et non naturels et d'autre part d'introduire sur le squelette pseudopeptidique des chaînes latérales susceptibles de moduler ses caractéristiques biophysiques. L'introduction de groupements favorisant le passage de ces analogues à travers les membranes cellulaires (chaînes lipophiles) ou augmentant leur solubilité dans le milieu plasmatique (groupements perfluorés par exemple) nous permet de moduler, voire, d'optimiser la biodisponibilité de ces composés.

#### a) Monomères aza- $\beta^3$ -amino acides

Deux méthodologies de synthèse sont utilisées pour obtenir les monomères aza- $\beta^3$ -amino acides à partir des hydrazines convenablement substituées et protégées, selon la nature des chaînes latérales que l'on désire mimer.

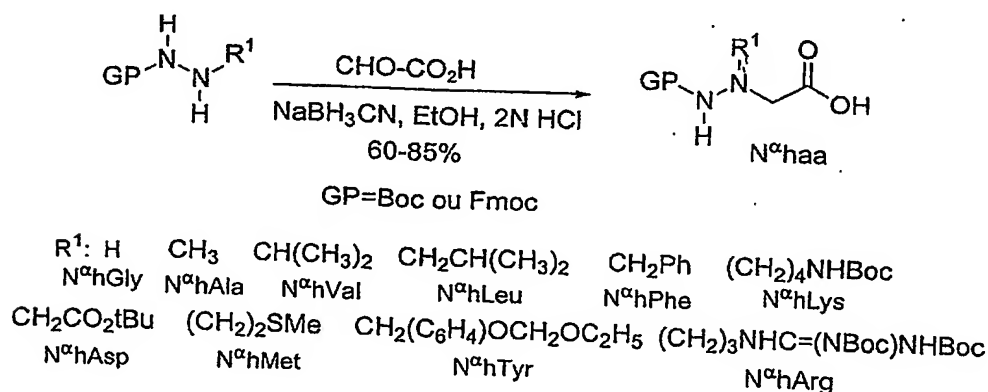
- Soit par bromoacétylation d'hydrazines N,N'-disubstituées, la déprotection du monomère orthogonalement protégé conduisant à l'aza  $\beta^3$  amino acide désiré avec des rendements de l'ordre de 60-80 %.



Cette méthode consistant à réaliser une substitution nucléophile puis une déprotection a été publiée dans Synlett : New Monomers for Solid Phase Synthesis of Hydrazinopeptoides: the N<sup>α</sup>-Substituted-N<sup>β</sup>-Protected hydrazinoglycines and N<sup>α</sup>-Substituted-N<sup>β</sup>-Protected hydrazinoglycinal. A. Cheguillaume, I. Doubli-Bounoua, M. Baudy-Floc'h, P. Le Grel, *Synlett* 2000, 3, 331-334.

- Soit par amination réductrice de l'acide glyoxylique.

Cette méthode est une nouvelle méthode de synthèse des Fmoc-aza-β<sup>3</sup> amino acides (N<sup>α</sup>haa): A une suspension d'hydrazine substituée Fmoc protégée (1eq) dans 50ml d'EtOH, de l'acide glyoxylique (1.1eq) est ajouté sous agitation. Après 0.5h, NaBH<sub>3</sub>CN (1.2eq) est ajouté au mélange, le pH est ajusté à 3-4 par addition d'HCl 2N, après 0.5h supplémentaire le pH est ajusté à 1. Après 10 min d'agitation le mélange réactionnel est concentré par évaporation, puis dilué par addition de 100 mL d'acétate d'éthyle. La solution est lavée successivement par NaHCO<sub>3</sub> (5%) et de la brine puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation du solvant, on obtient le monomère Fmoc-aza-β<sup>3</sup> amino acide avec des rendements de l'ordre de 82-87%.



#### a-1) Fmoc aza-β<sup>3</sup>-Glycine (Fmoc-N<sup>α</sup>hGly-OH)

A une suspension de Fmoc carbazate (1eq) dans 50ml d'EtOH, de l'acide glyoxylique (1.1eq) est ajouté sous agitation. Après 0.5h, NaBH<sub>3</sub>CN (1.2 eq) est ajouté au mélange, le pH est ajusté à 3-4 par addition d'HCl 2N, après 0.5h



supplémentaire le pH est ajusté à 1. Après 10 min d'agitation le mélange réactionnel est concentré par évaporation, puis dilué par addition de 100 mL d'acétate d'éthyle. La solution est lavée successivement par NaHCO<sub>3</sub> (5%) et de la brine puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation du solvant, on obtient le monomère Fmoc-aza-β<sup>3</sup> glycine avec un rendement de 86%.

mp: 122-124°C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO) : 3.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.90 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, Ar), 10.0 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO): 162.90, 144.07, 141.59, 128.06, 127.38, 125.44, 120.30, 67.37, 58.00, 47.43. HRMS: (M<sup>+</sup>) Calc. pour C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 295.1082; Tr: 295.1083.

#### a-2) Fmoc-aza-β<sup>3</sup>-Aspartique acide (Fmoc-N<sup>α</sup>hAsp(OtBu)-OH).

a-2-1) Fmoc NH-NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu: A une solution de 2.54g de Fmoc carbazate (10 mmol) dans 10ml DMF, une solution de 1.95g de bromoacetate de tert-butyl (10mmol) dans 10ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est ajoutée goutte à goutte sous agitation à température ambiante. Après 12h d'agitation, le solvant est partiellement évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (ethyl acetate / hexane 1/1) pour obtenir 2.79g (rendement: 76%) sous forme d'huile incolore qui cristallise lentement.

mp.114-116°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.50 (s, 9H, tBu), 3.61 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.44 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.90 (brs, 1H, NH), 7.20-7.80 (m, 13H, ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 171.55, 162.90, 144.07, 141.59, 128.06, 127.38, 125.44, 120.30, 82.21, 67.37, 53.10, 47.43, 28.42. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 368.1736 Calc: C, 68.45; H, 6.57; N, 7.61; Tr., C, 68.56; H, 6.73; N, 7.62.

#### a-2-2) Fmoc-N<sup>α</sup>hAsp(OtBu)-OH :

Le monomère Fmoc-N<sup>α</sup>hAsp(OtBu) est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc NH-NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu décrit plus haut

87% ; mp: 98-100°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.50 (s, 9H, tBu), 3.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.22 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.20 (brs, 1H, NH), 7.22-7.84 (m, 8H, ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 171.23, 171.00, 158.03, 143.61, 141.76, 128.33, 127.59, 125.33, 120.50, 83.80, 68.19, 59.20, 58.80, 47.49,

28.53. HRMS: (M<sup>+</sup>) Calc. pour C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 426.1790; Tr: 426.1790 Anal. calc: C, 64.76; H, 6.15; N, 6.57; Tr, C, 64.84; H, 6.18; N, 6.58.

### a-3) Fmoc aza-β<sup>3</sup>-Methionine (Fmoc-N<sup>α</sup>hMet-OH)

a-3-1) Fmoc NH-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SMe : A une solution de Methyl Thio Acetaldehyde Dimethylacetal (5g, 36mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 16ml d'HCl (1%) est additionné. Après agitation à température ambiante pendant 0.5h, une suspension de Fmoc cabazate (8.38g, 33mmol) dans 100ml de THF est additionnée. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation pendant 12h. 2.14g de cyanoborohydrure de sodium (34mmol) sont ensuite ajoutés par fractions sur une période de 45min, le pH étant maintenu à 3-4 par addition par une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis ajusté à pH 1. Le mélange est dilué dans 50ml d'acétate d'éthyle, neutralisé par NaHCO<sub>3</sub> et lavé par de la brine. Les phases aqueuses sont extraites par 3x50ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé et l'huile obtenue est reprise à l'ether de pétrole pour donner un précipité de 4.54g (42%).

mp: 132°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.64 (t, 2H, J = Hz, CH<sub>2</sub>), 3.12 (t, 2H, J = Hz, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, J = 6.6 Hz, CH), 4.52 (d, 2H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.46 (brs, 1H, NH), 7.25-7.82 (m, 8H, ar), 8.21 (brs, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 157.67, 144.05, 141.75, 128.21, 127.51, 125.39, 120.46, 67.41, 50.09, 47.58, 32.63, 15.66. Anal calc. pour C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S 328.1245: C, 65.83; H, 6.14; N, 8.54; S, 9.74. Tr: C, 65.90; H, 6.18; N, 8.62; S, 9.69.

### a-3-2) Fmoc-N<sup>α</sup>hMet-OH:

Le monomère Fmoc-N<sup>α</sup>hMet-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc NH-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SMe décrit plus haut

83%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (t, 2H, J = Hz, CH<sub>2</sub>), 3.15 (t, 2H, J = Hz, CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.20 (t, 1H, J = 6.6 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.95 (brs, 1H, NH), 7.25-7.82 (m, 8H, ar), 9.24 (sl, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 173.42, 156.02, 143.87, 141.76, 128.26, 127.54, 125.38, 120.45, 67.54, 59.18, 56.70, 47.56, 30.12, 16.09. HRMS [M+H]<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S Calc: 387.1379; Tr: 387.1379.

a-4) Fmoc aza- $\beta^3$ -Tyrosine (Fmoc-N $^{\alpha}$ H Tyr(OCH<sub>2</sub>OEt)-OH)

a-4-1) 4-(ethyloxymethyloxy)benzaldehyde: A un mélange de 4-hydroxybenzaldehyde (5g, 0.041 mol) et de 12ml de triéthylamine dans 30ml de THF est ajouté une solution de chlorométhyl éthyl éther (5.65g, 0.06mol) dans 20ml THF à 0°C et le mélange est agité à température ambiante pendant 2h. Le chlorhydrate de triéthylamine est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le 4-ethyloxymethyloxy benzaldehyde sous forme d'huile (6.63g, 90%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.70 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.15-7.80 (m, 4H, ar), 10.10 (s, 1H, CHO).

a-4-2) Fmoc-NH-NHCH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)OCH<sub>2</sub>OEt : 5.6g de Fmoc cabazate (22mmol) est ajouté sous agitation à une solution de 4-(ethyloxymethyloxy)benzaldehyde (5.3g, 29mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange est agité pendant 1h. 1.57g de cyanoborohydrure de sodium (25mmol) est ajouté en 45min et le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl (2N). Après 2h d'agitation, le pH est ajusté à 1. 50ml d'acétate d'éthyle sont alors additionnés et le mélange est neutralisé par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. La phase aqueuse est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50ml). Les phases organiques sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile qui par addition d'éther de pétrole donne un précipité blanc (5.34g, 58%).

Mp: 113°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.70 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.98 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.30 (brs, 1H, NH), 7.15-7.80 (m, 13H, ar), 8.21 (brs, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 157.49, 144.06, 141.76, 130.70, 128.19, 127.50, 125.40, 120.44, 116.68, 93.58, 67.36, 64.65, 55.48, 47.60, 15.53. Anal.Calc : C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 418.1892. C, 71.74 ; H, 6.27; N, 6.70; Tr : C, 71.78; H, 6.29; N, 6.70.

a-4-3) Fmoc-N $^{\alpha}$ H Tyr (OCH<sub>2</sub>OEt)-OH :

Le monomère Fmoc-N $^{\alpha}$ H Tyr (OCH<sub>2</sub>OEt)-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc-NH-NHCH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)OCH<sub>2</sub>OEt décrit plus haut

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.25 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.68 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.20 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H,

$J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.26 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.80 (brs, 1H, NH), 7.25-7.80 (m, 8H, ar), 8.60 (brs, 1H, NH), 9.80 (br s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 173.40, 157.68, 156.02, 143.93, 141.74, 131.04, 128.23, 127.55, 125.43, 120.43, 116.73, 93.48, 66.30, 64.68, 61.11, 59.00, 47.51, 15.61. HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$  Calc: 477.2026; Tr: 477.2023. Anal. Calc: C, 68.04; H, 5.93; N, 5.88; Tr: C, 68.00; H, 5.90; N, 5.87.

### a-5) Fmoc aza- $\beta^3$ Arginine (Fmoc- $\text{N}^\alpha\text{hArg}$ (Boc)-OH)

#### a-5-1) 1-tert-Butoxycarbonylamino-3,3-diethoxypropane:

Un mélange de di-tert-butyl dicarbonate (9g, 40 mmol.) dans le dioxane (40ml) est additionné goutte à goutte, à une solution, sous agitation et à  $0^\circ\text{C}$ , de 1-amino-3,3-diéthoxypropane (5.52g, 37 mmol) et de  $\text{Et}_3\text{N}$  (4.04g, 40 mmol) dans 5ml dioxane. Après 2h, le mélange est agité à température ambiante 12h puis le solvant est évaporé. L'huile résiduelle est reprise par 10mL d'eau, acidifiée avec 30ml HCl (1%), puis extraite à l'acétate d'éthyle (60ml x 3). Les phases organiques sont séchées ( $\text{MgSO}_4$ ) et évaporées pour donner 8.89 g de 1-tert-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diéthoxypropane (90%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.20 (t, 6H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.60-2.00 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}$ ), 3.00-3.80 (m, 6H,  $\text{OCH}_2+\text{NHCH}_2$ ), 4.50 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz, CH), 5.05-5.10 (br, 1H, NH).

a-5-2) 3-tert-Butoxycarbonylaminopropanal: Une solution de 1-tert-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diéthoxypropane (8.89g, 36mmol) dans 15ml d'acide acétique et 4ml d'eau est agitée à température ambiante pendant 10h, puis neutralisée par  $\text{NaHCO}_3$ , reprise à l'acétate d'éthyle et lavée à brine. Les phases organiques sont évaporées à pression réduite pour donner 5.17g de 3-tert-butoxycarbonylaminopropanal (83%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.45 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.60-2.80 (t, 2H,  $\text{CCH}_2$ ), 3.20-3.50 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 5.10-5.20 (br s, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, CHO).

a-5-3) Fmoc-NH-NH( $\text{CH}_2$ ) $_3$  NHBoc: 5.08g de Fmoc carbazate (20mmol) est additionné à une solution sous agitation de 3-tert-Butoxycarbonylaminopropanal (3.46g, 20mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange réactionnel est agité pendant 12h. 1.26g de cyanoborohydrure de sodium (20mmol) est ajouté par fractions en 45min. Le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis le pH

est ajusté à 1. 50 mL d'acétate d'éthyle sont alors ajouté au mélange, la solution est neutralisée par  $\text{NaHCO}_3$ . Le mélange est extrait par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x50ml). Les phases organiques sont séchées ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et le solvant est évaporé pour donner une huile qui cristallise par addition d'éther de pétrole (4.27g, 52%).

5 mp: 101°C.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO) 1.40 (s, 9H, tBu), 1.50 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.98 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.24 (t, 1H,  $J = 6.9$  Hz, CH), 4.32 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.70-4.85 (brs, 1H, NH), 6.78 (brs, 1H, NH), 6.80 (brs, 1H, NH), 7.25-7.90 (m, 8H, ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO) 157.21, 155.95, 144.18, 142.94, 127.98, 127.64, 125.59, 120.46, 77.71, 65.82, 47.08, 38.39, 28.62, 28.21. HRMS calc  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ : 411.2158  
10 Anal Calc  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 67.12; H, 7.11; N, 10.22. Tr: C, 67.22; H, 7.19; N, 10.24.

#### a-5-4) Aza- $\beta^3$ -(Boc)homolysinate de benzyle

A une solution d'hydrazine Fmoc protégée Fmoc-NH-NH( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub> NHBoc obtenue lors de l'étape précédente (3.7g, 9mmol) et de 2-bromoacetate de benzyle (2.66g, 11.6mmol) dans 20ml de toluène est ajoutée  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (802mg, 5.8mmol). Le mélange  
15 est porté à reflux sous agitation pendant 28h. La solution est filtrée et évaporée sous vide. Le brut est chromatographié sur gel de silice (ethyl acetate/hexane 1/3) pour donner 3.02g (60%) d'aza- $\beta^3$ -(Boc)homolysinate de benzyle sous forme d'huile qui précipite lentement.

mp: 107°C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.50 (s, 9H, tBu), 1.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.20 (t, 1H,  $J = 6.9$  Hz, CH), 4.50 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.19 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.88 (brs, 1H, NH), 7.25-7.90 (m, 13H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 171.23, 156.55, 155.50, 144.13, 141.77, 135.54, 129.13, 129.04, 128.84, 128.14, 127.47, 125.44, 120.40, 79.38, 67.09, 64.47, 57.63, 54.56, 47.67, 38.83, 28.85, 27.83. HRMS calc.:  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ : 559.2682. Anal calc.  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ : C, 68.66; H, 6.67; N, 7.51. Tr: C, 68.59; H, 6.86; N, 7.28.  
25

#### a-5-5) Aza- $\beta^3$ -homolysinate de benzyle

A une solution de d'aza- $\beta^3$ -(Boc)homolysinate de benzyle (0.56g, 1mmol) dans 4 mL de DCM, 2 mL de TFA sont ajoutés et la solution est agitée pendant 6h à température ambiante. Une évaporation sous pression réduite conduit à l'aza- $\beta^3$ -homolysinate de benzyle (0.41g, 92%) sous forme d'huile.  
30

#### a-5-6) Aza- $\beta^3$ -arginate (N-Boc) de benzyle

L'aza- $\beta^3$ -homolysinate de benzyle (0.18g, 0.40mmol) en solution dans 5ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est lentement additionné à une solution de  $(\text{BocNH})_2\text{C}=\text{NTf}$  (0.16g,

0.41mmol) [(BocHN)<sub>2</sub>C=NTf est préparé selon la méthodologie de Feichtinger, K; Zapf, C; Sings, H.L; Goodman, M. *J.Org.Chem.* 1998, 63, 3804] et de triéthylamine (0.64ml, 0.46mmol). Après agitation à température ambiante pendant 12h, la solution est lavée par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (25ml) et la phase aqueuse est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50ml). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées in vacuo. Le brut, purifié par flash chromatographie (ethyl acetate/hexane 1/2), conduit à l'aza-β<sup>3</sup>-arginate (N-Boc) de benzyle 0.23g (85%).

mp: 70-72°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.39 (s, 18H, tBu), 1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.24 (t, 1H, J = 7.1 Hz, CH), 4.45 (d, 2H, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.95 (brs, 1H, NH), 7.27-7.82 (m, 13H, Ar), 8.28 (brs, 1H, NH), 11.45 (brs, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 171.45, 170.80, 163.97, 156.57, 153.59, 144.17, 141.73, 135.67, 129.06, 128.91, 128.78, 128.09, 127.45, 125.47, 120.34, 83.35, 79.48, 66.93, 60.74, 58.04, 53.89, 47.64, 38.83, 28.67, 28.44, 27.45. HRMS C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> Calcd. 701.3424 Anal. Calcd for C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> C, 65.02; H, 6.75; N, 9.98. Found: C, 65.10; H, 6.83; N, 9.98.

#### a-5-7) FmocN<sup>α</sup>hArg(Boc)-OH :

30mg de Pd/C à 10% sont ajoutés à une solution d'aza-β<sup>3</sup>-arginate (N-Boc) de benzyle (0.35g, 0.5mmol) dans 25ml d'éthanol sous atmosphère d'hydrogène. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6h. Le catalyseur est filtré sur celite. La celite est lavé par EtOH (3x15ml) et le filtrat est évaporé pour conduire à 0.26g (89%) d'aza-β<sup>3</sup>-arginine (N-Boc) sous forme d'huile qui cristallise lentement.

Mp: 94°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.38 (s, 9H, tBu), 1.39 (s, 9H, tBu), 1.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.14 (t, 1H, J = 7.1 Hz, CH), 4.40 (d, 2H, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.27-7.82 (m, 8H, Ar), 7.95 (br s, 1H, NH), 8.50 (br s, 1H, NH), 11.50 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 171.35, 170.70, 163.90, 157.45, 153.57, 143.96, 141.75, 128.18, 127.52, 127.31, 125.44, 120.38, 83.35, 79.60, 67.42, 58.04, 53.89, 47.61, 38.83, 28.59, 28.46, 27.47. HRMS calc pour C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> (M<sup>+</sup>) 611.2955. Tr (M<sup>+</sup>) 611.2958. Anal. Calc. for C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: C, 60.85; H, 6.76; N, 11.45. Tr. C, 60.95; H, 6.78; N, 11.47.

#### a-6) Fmoc aza-β<sup>3</sup>-Lysine (Fmoc-N<sup>α</sup>hLys-OH)

a-6-1) 1-tert-Butoxycarbonylamino-3,3-diethoxybutane: Un mélange de di-tert-butyl dicarbonate (9.6 g, 40 mmol.) dans le dioxane (40ml) est

additionné goutte à goutte, à une solution, sous agitation et à 0°C, de 1-amino-3,3-diéthoxybutane (5.9, 37 mmol) et de Et<sub>3</sub>N (4.04g, 40 mmol) dans 5ml dioxane. Après 2h, le mélange est agité à température ambiante 12h puis le solvant est évaporé. L'huile résiduelle est reprise par 10mL d'eau, acidifiée avec 30ml HCl (1%), puis extraite à l'acétate d'éthyle (60ml x 3). Les phases organiques sont séchées (MgSO<sub>4</sub>) et évaporées pour donner 9.4 g de 1-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diéthoxybutane (90%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.20 (t, 6H, *J* = 8.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.60-1.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>C), 3.15 (m, 2H NCH<sub>2</sub>), 3.48 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.85 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.45 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, CH), 4.65-4.70 (br, 1H, NH).

**a-6-2) 3-*tert*-Butoxycarbonylaminobutanal:** Une solution de 1-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diéthoxybutane (1.61g, 6.2 mmol) dans 12ml d'acide acétique et 6ml d'eau est agitée à température ambiante pendant 5h, puis neutralisée par NaHCO<sub>3</sub>, reprise à l'acétate d'éthyle et lavée à brine. Les phases organiques sont évaporées à pression réduite pour donner 1.27g d'une huile correspondant au 3-*tert*-butoxy carbonylaminobutanal en équilibre avec l'hydroxy-2-pyrazolidine.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.70-2.00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.20-3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.30-5.40 (br s, 1H, NH), 9.86 (s, CHO).

**a-6-3) Fmoc-NH-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> NHBoc:** 5.08g de Fmoc carbazate (20mmol) est additionné à une solution sous agitation de 3-*tert*-Butoxycarbonylaminobutanal (3.46g, 20mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange réactionnel est agité pendant 12h. 1.26g de cyanoborohydrure de sodium (20mmol) est ajouté par fractions en 45min. Le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis le pH est ajusté à 1. 50 mL d'acétate d'éthyle sont alors ajouté au mélange, la solution est neutralisée par NaHCO<sub>3</sub>. Le mélange est extrait par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50ml). Les phases organiques sont séchées (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et le solvant est évaporé pour donner une huile qui cristallise par addition d'éther de pétrole (4.27g, 52%).

84%. mp: 149°C <sup>1</sup>H NMR (DMSO): 1.45 (s, 9H, tBu), 1.55 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.65 (br s, 1H, NH), 6.45 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, ar). <sup>13</sup>C NMR (DMSO): 158.53, 156.06, 144.13, 141.07, 128.00, 127.41, 125.55, 120.44,

77.73, 65.82, 50.05, 47.05, 40.52, 28.58, 27.47, 24.93. Anal. Calc :  $C_{24}H_{31}N_3O_4$  425.2314 C, 67.73; H, 7.35; N, 9.88; Tr: C, 67.70; H, 7.33; N, 9.87.

**a-6-4) Fmoc-N<sup>α</sup>hLys(Boc)-OH:**

5 Le monomère Fmoc-N<sup>α</sup>hLys(Boc)-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc-NH-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHBoc décrit plus haut

82%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.45 (s, 9H, tBu), 1.55 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.80 (br s, 1H, NH), 6.90 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 10 170.97, 156.49, 156.00, 144.17, 141.76, 128.84, 128.14, 125.48, 120.40, 79.38, 67.04, 58.00, 56.52, 47.64, 40.53, 28.83, 27.68, 25.01. HRMS C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> Calc: 506.2267; Tr: 506.2265.

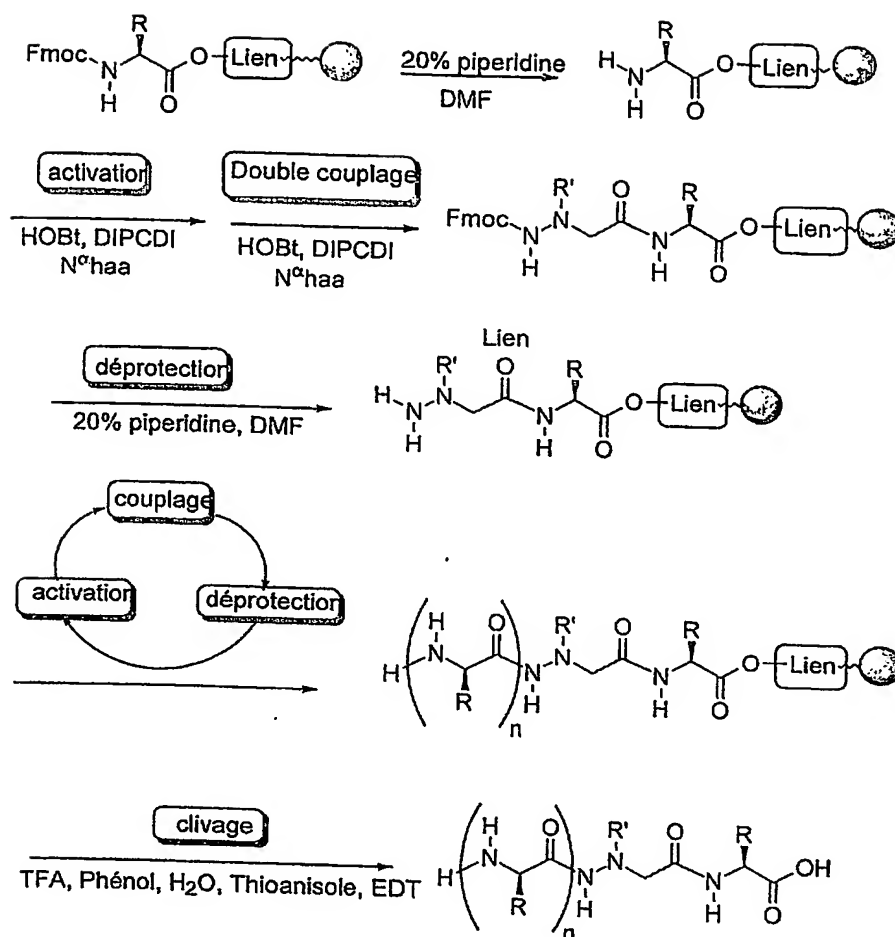
15

**b) Synthèse peptidique : Peptides Hybrides**

Les monomères décrits ci-dessus peuvent, à l'instar d'un amino acide protégé, être intégrés dans des positions choisies d'un peptide par synthèse sur support solide à l'aide d'un automate de synthèse à stratégie Fmoc afin d'obtenir des peptides 20 hybrides. Ils peuvent également être associés pour conduire à des oligomères constitués exclusivement d'unités aza-β<sup>3</sup>-amino acides.

La synthèse des peptides hybrides a été effectuée selon le schéma suivant :





La synthèse des analogues peptidiques a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique modèle PepSynthesizer™ 9050, Milligen, fonctionnant en stratégie Fmoc en condition de flux continu. Les groupements fonctionnels des chaînes latérales des Fmoc-aminoacides sont protégés par les groupements protecteurs suivants: un groupement *t*-butoxycarbonyle (Boc) pour la Lysine (Lys), *t*-Butyl (tBu) pour la Tyrosine (Tyr) et la Thréonine (Thr), triphénylméthyle (Trt) pour la Glutamine (Gln) et 2,2,4,5,6,-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) pour l'Arginine (Arg). Le DMF ne doit contenir aucune amine susceptible de déprotéger le groupement Fmoc au cours de la synthèse et la pipéridine utilisée pour les étapes de déprotection est pure à 99%. Le diisopropylcarbodiimide (DIPCPI) et le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) sont utilisés en tant qu'agents de couplage.

La résine (1.00 g) préchargée (à  $\sim 0.2$  mmol/g) par un résidu amino acide ou aza- $\beta^3$ -aminoacide est placée dans le réacteur du synthétiseur. Les couplages sont réalisés avec quatre fois la stoechiométrie en amino acide ou en aza- $\beta^3$ -aminoacide et un temps de couplage de 30 mn, et selon les amino acides ou les aza- $\beta^3$ -aminoacides

utilisés, un double couplage ou un temps de couplage de 60 mn est nécessaire. Après chaque étape de couplage et en fin de synthèse, l'extrémité N-terminale du dernier résidu greffé est déprotégée automatiquement par une solution à 20% de pipéridine dans le DMF.

5 Le clivage de la résine et la déprotection des groupements fonctionnels des chaînes latérales sont réalisés simultanément par action du réactif K (82.5 % TFA, 5 % phénol, 5 % eau, 5 % thioanisole et 2.5 % éthanedithiole). La résine est extraite du réacteur et rincée au dichlorométhane, puis séchée au dessiccateur. Elle est placée dans un ballon puis le cocktail de clivage K fraîchement préparé est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 h à température ambiante. La solution contenant le peptide hybride est ensuite récupérée par filtration de la résine sur fritté. 10 Après évaporation du solvant sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 2 mL, le peptide hybride brut est isolé par précipitation dans l'éther glacé et filtration sur fritté. Il est purifié par HPLC sur une colonne phase inverse C18 (250 x 4.6 mm) selon un gradient d'élution (solvant A : eau + TFA 0.1 % et solvant B acétonitrile + TFA 0.08 %) 0% B à 70% B en 20min puis 70% B à 0% B en 5 min, avec un débit de 1.2 mL / min. La détection UV est réalisée à 210 nm. La pureté des peptides hybrides synthétisés est contrôlée en spectrométrie de masse par la technique ESI dans un mélange acétonitrile / eau (50 / 50).

20 La synthèse d'analogues du peptide 88-99 de l'histone H4, pour lequel nous avons remplacé avec succès différentes positions, a été réalisée selon cette méthodologie. Pour exemple les monomères Ala, Leu, Lys, Tyr, Gly ont été remplacés par leur analogue respectif  $N^{\alpha}hAla$ ,  $N^{\alpha}hLeu$ ,  $N^{\alpha}hLys$ ,  $N^{\alpha}hTyr$ ,  $N^{\alpha}hGly$  etc ....

25 Peptide 88-99 de l'histone H4:

H-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH

Exemples de peptides hybrides préparés:

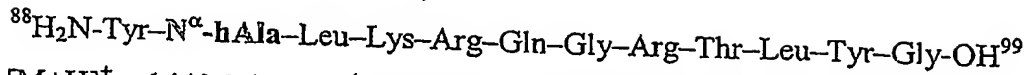
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):

30  $^{88}H_2N$ -Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr- $N^{\alpha}hLeu$ -Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>  
 $[M+H]^+ = 1440.8$  ( $[M+H]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[M+2H]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):

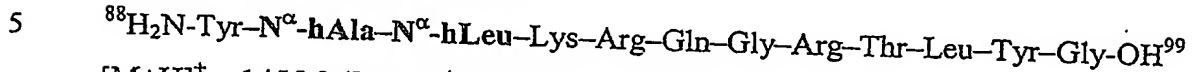
$^{88}H_2N$ -Tyr-Ala- $N^{\alpha}hLeu$ -Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH<sup>99</sup>  
 $[M+H]^+ = 1440.8$  ( $[M+H]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[M+2H]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



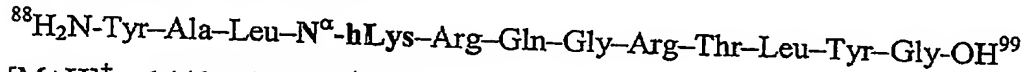
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



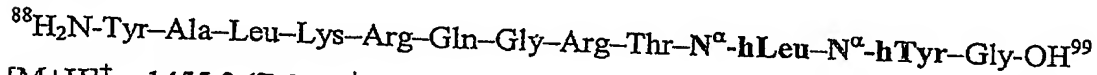
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1455.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 728.4$ .

- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



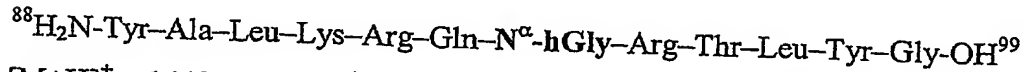
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720.9$ .

10 - SEQ ID NO : 7 :



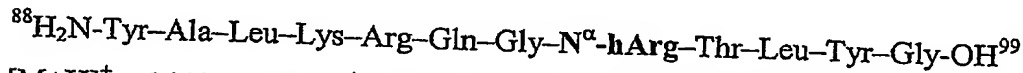
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1455.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 728.4$ .

- SEQ ID NO : 8 :



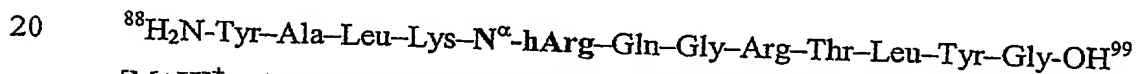
15  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 9 :



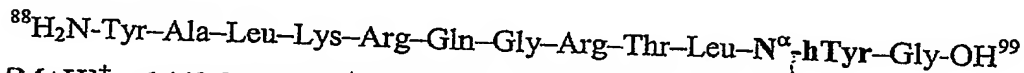
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 10 :



$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720.9$ .

- SEQ ID NO : 11 :



25  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1440.8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé  $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 720$ .

## 2) Analyses biologiques

Les souris BALB/c ont été immunisées avec le peptide parent 88-99 H4 et dans les cultures les lymphocytes T de ces souris ont été restimulés avec le même peptide ou avec les analogues A-E. La prolifération cellulaire a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée et l'indice de stimulation (IS) par rapport aux puits sans peptide a été calculé. Les tests sont réalisés en triplicat et l'expérience est réalisée plusieurs fois dans des expériences indépendantes. Les premiers résultats (voir figure 1) montrent qu'un des peptides modifiés, à savoir l'analogue E (IS de 7.7 à 90 $\mu\text{M}$ ) a une activité

analogue, voir supérieure selon les expériences, à celle du peptide parent (IS de 6.7 à 90 $\mu$ M).

5 Par ailleurs une manip miroir de la précédente a été réalisée, à savoir des tests de réponse sur les lymphocytes T de souris injectées avec les peptides modifiés et stimulation ex vivo avec le peptide parent (88-99). Après injection des analogues, des analyses ont été réalisées sur des cultures de cellules avec lesdits analogues et le peptide parent 88-99. On observe les résultats suivants :

10 1) les peptides A et D sont immunogènes (induisent des réponses contre le peptide homologue) mais sans réaction croisée avec le peptide parent (voir figure 2).

2) le peptide E est immunogène et les cellules T générées réagissent par réaction croisée avec le peptide parent (voir figure 3).

15 Le peptide E croise parfaitement avec le peptide parent 88-99.

#### Légende des figures :

20 - Figure 1 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de sourisBALB/c injectées avec le peptide parent 88-99 de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund, et stimulation ex-vivo avec le peptide parent ou l'analogue E ; L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

25 - Figure 2 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de sourisBALB/c injectées avec le peptide modifié 88-99 A ou avec le peptide modifié 88-99 D de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

30 - Figure 3 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de sourisBALB/c injectées avec le peptide modifié 88-99 E de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

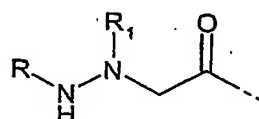
# Bibliographie

- Appella, E.; Loftus, D.J.; Sakaguchi, K.; Celis, E. *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1996, 1, 177.
- 5 Mézière, C.; Viguiier, M.; Dumortier, H.; Lo-Man, R.; Leclerc, C.; Guillet, J.G.; Briand, J.P.; Muller, S. *J. Immunol.* 1997, 3230-3237.
- Briand, J.P.; Benkirane, N.; Guichard, G.; Newman, J.F.E.; Van Regenmortel, M.H.V.; Brown, F.; Muller, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94, 12545-12550.
- Liu, M.A. *Nat. Med.*, 1998, 4, Suppl. 5, 503.
- 10 Stemmer, C.; and Guichard, G. *Exp. Opin. Ther. Patents* 1998, 8, 819-830.
- Ostankovitch, M, Guichard, G, Connan, F, Muller, S, Chaboissier, A, Hoebeke, J, Choppin, J, Briand, JP, Guillet, JG. *J Immunol* 1998; 161:200-8.
- Petit, M.C.; Benkirane, N.; Guichard, G.; Phan Chan Du, A.; Marraud, M.; Cung, M.T.; Briand, J.P.; Muller, S. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 3686-3692.
- 15 Stemmer, C.; Quesnel, A.; Prévost-Blondel, A.; Zimmermann, C.; Muller, S.; Briand, J.P.; Pircher, H. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 5550-5555
- Ben Yedidia, T., Beignon, AS, Partidos, CD, Muller, S. and Armon, A. *Mol. Immunol.* 2002, 39, 323-331.
- Phan-Chan Du, A., Limal, D., Semetey, V., Dali, H., Jolivet, M., Desgranges, C., Cung, MT, Briand, JP, Petit, MC and Muller, S. *J. Mol Biol.* 2002, 323, 503-521.
- 20 Decker, P., Le Moal, A. , Briand, J.P., Muller. S. *J. Immunol.* 2000, 165, 654-662.

# REVENDICATIONS

1. Utilisation de peptides hybrides analogues de peptides ou protéines parents, ces peptides hybrides comprenant au moins un résidu aza-β<sup>3</sup> aminoacyle, à savoir :

- 5 - un résidu répondant à la formule (A) suivante lorsqu'il est situé en position N-terminale,

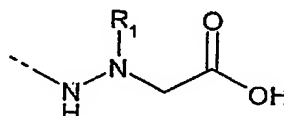


(A)

- 10 dans laquelle R représente H ou un groupe protecteur de la fonction amine des aminoacides, tels que Fmoc, Boc, ou Z, et R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (B) suivante lorsqu'il est situé en position C-terminale,

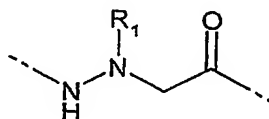
15



(B)

dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- 20 - un résidu répondant à la formule (C) suivante lorsqu'il est situé dans la chaîne desdits peptides hybrides,



(C)

- 25 dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

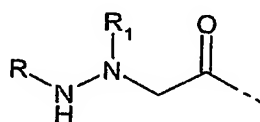
pour la préparation:

- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence, dans l'organisme d'un individu, d'une protéine

# REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, caractérisée en ce qu'elle comprend, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable, un peptide hybride analogue de peptides ou protéines parents, ce peptide hybride comprenant au moins un résidu aza-β<sup>3</sup> aminoacyle, à savoir :

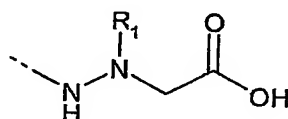
- un résidu répondant à la formule (A) suivante lorsqu'il est situé en position N-terminale,



(A)

dans laquelle R représente H ou un groupe protecteur de la fonction amine des aminoacides, tels que Fmoc, Boc, ou Z, et R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

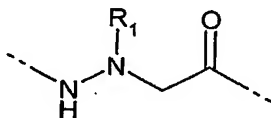
- un résidu répondant à la formule (B) suivante lorsqu'il est situé en position C-terminale,



(B)

dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (C) suivante lorsqu'il est situé dans la chaîne desdits peptides hybrides,



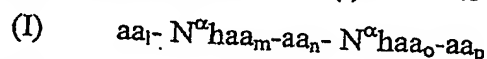
(C)

dans laquelle R<sub>1</sub> représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides.

- exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ou
- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T,
  - d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu d'un anticorps susceptible d'être reconnu par un susdit peptide hybride,
  - ou pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies susmentionnées.

## 2. Utilisation selon la revendication 1 :

\* de peptides hybrides de formule (I) suivante :



dans laquelle :

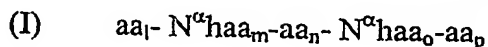
- $aa_1$ ,  $aa_n$  et  $aa_p$  représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,
- $N^{\alpha}haa_m$  et  $N^{\alpha}haa_o$  représentent un résidu monomère aza- $\beta^3$  aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles,
- l, m, n, o, et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, et que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4 à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 1, dont l'un au moins des acides aminés initiaux est substitué par un résidu



2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, comprenant :

\* des peptides hybrides de formule (I) suivante :



dans laquelle :

-  $aa_l$ ,  $aa_n$  et  $aa_p$  représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

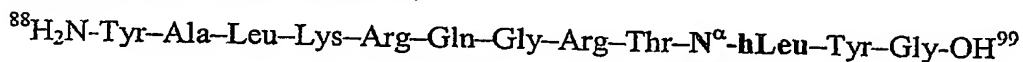
-  $N^{\alpha}haa_m$  et  $N^{\alpha}haa_o$  représentent un résidu monomère aza- $\beta^3$  aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles,

- l, m, n, o, et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, et que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4.

3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, comprenant des peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4 à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 1, dont l'un au moins des acides aminés initiaux est substitué par un résidu analogue aza- $\beta^3$  acide aminé, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement du lupus érythémateux disséminé.

4. Composition pharmaceutique selon la revendication 3, comprenant des peptides hybrides de formules suivantes :

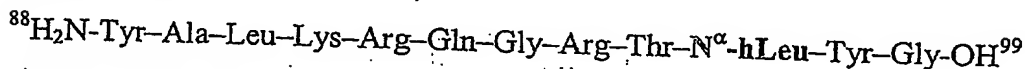
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



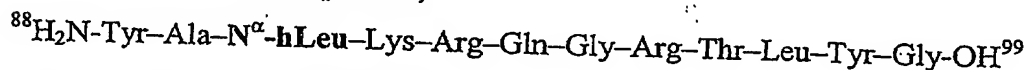
analogue aza- $\beta^3$  aminoacide, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement du lupus érythémateux disséminé.

5 4. Utilisation selon la revendication 3, de peptides hybrides de formules suivantes :

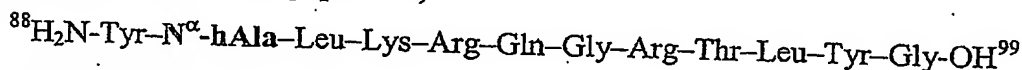
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



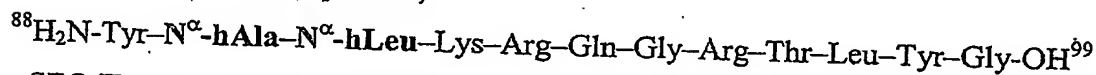
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



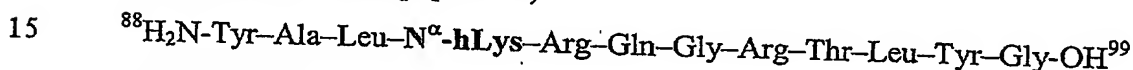
10 - SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



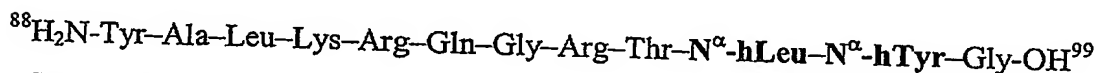
- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



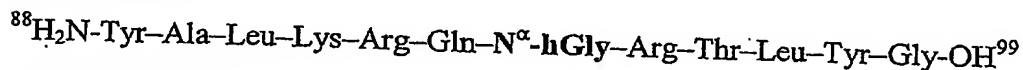
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



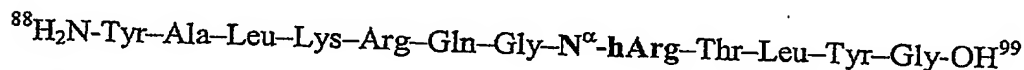
- SEQ ID NO : 7 :



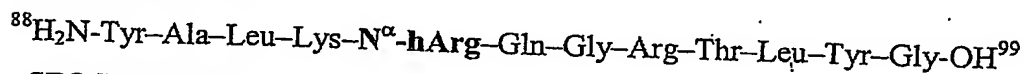
- SEQ ID NO : 8 :



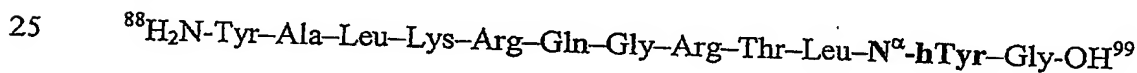
20 - SEQ ID NO : 9 :



- SEQ ID NO : 10 :



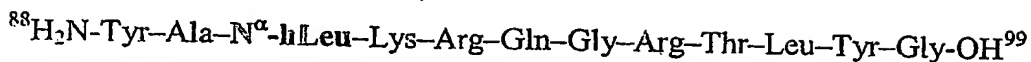
- SEQ ID NO : 11 :



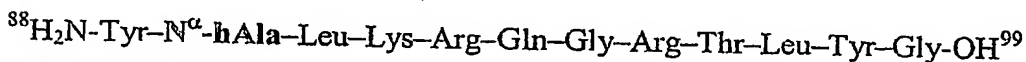
5. Utilisation selon la revendication 3 ou 4, du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 2.

30 6. Peptides hybrides comprenant au moins un aza- $\beta^3$  aminoacide, ces peptides hybrides étant des analogues de peptides ou protéines parents, lesdits peptides hybrides comprenant au moins un aminoacide initial du peptide ou de la protéine parent.

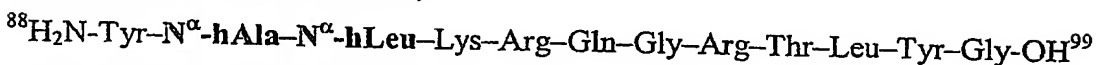
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



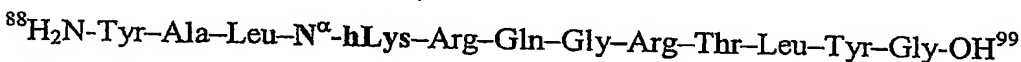
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



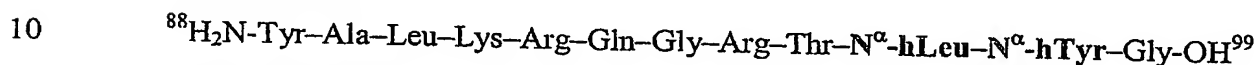
5 - SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



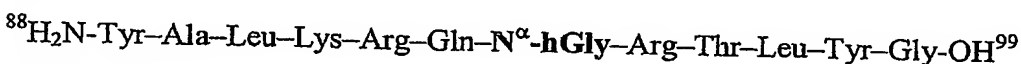
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



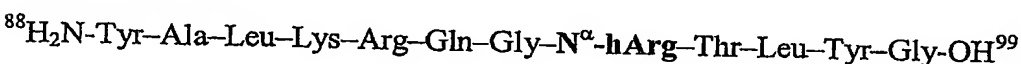
- SEQ ID NO : 7 :



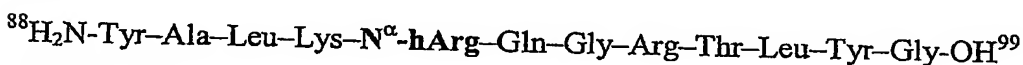
- SEQ ID NO : 8 :



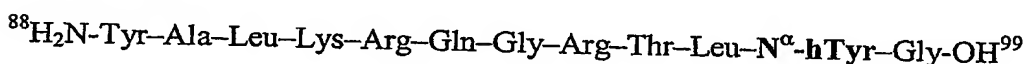
- SEQ ID NO : 9 :



15 - SEQ ID NO : 10 :



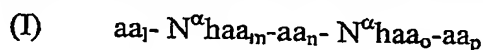
- SEQ ID NO : 11 :



20 5. Composition pharmaceutique selon la revendication 3 ou 4, comprenant le peptide hybride de formule SEQ ID NO : 2.

25 6. Peptides hybrides comprenant au moins un aza- $\beta^3$  aminoacide, ces peptides hybrides étant des analogues de peptides ou protéines parents, lesdits peptides hybrides comprenant au moins un aminoacide initial du peptide ou de la protéine parent.

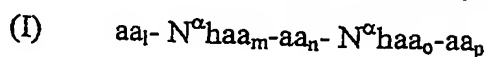
7. Peptides hybrides selon la revendication 6, de formule (I) suivante :



dans laquelle :

30 - aa<sub>1</sub>, aa<sub>n</sub> et aa<sub>p</sub> représentent un résidu aminoacycle, ou un enchaînement de résidus aminoacycles, correspondant aux résidus aminoacycles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

7. Peptides hybrides selon la revendication 6, de formule (I) suivante :



dans laquelle :

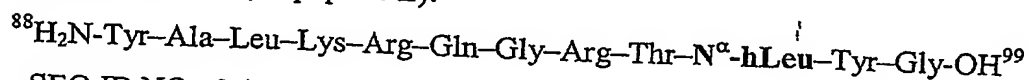
5 -  $aa_1$ ,  $aa_n$  et  $aa_p$  représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

10 -  $N^{\alpha}haa_m$  et  $N^{\alpha}haa_o$  représentent un résidu monomère aza- $\beta^3$  aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles  $R_1$  est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles,

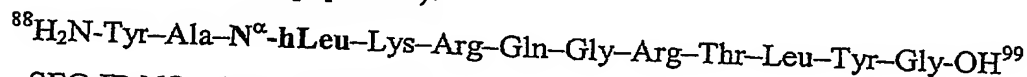
15 -  $l$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ , et  $p$  représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de  $m$  ou de  $o$  soit différent de zéro, que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4, et l'un au moins de  $l$ ,  $n$ , ou  $p$  soit différent de zéro.

8. Peptides hybrides selon la revendication 6 ou 7, de formules suivantes :

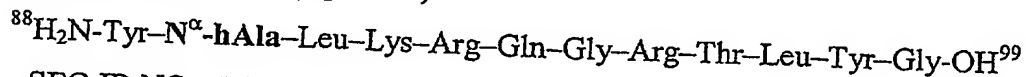
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



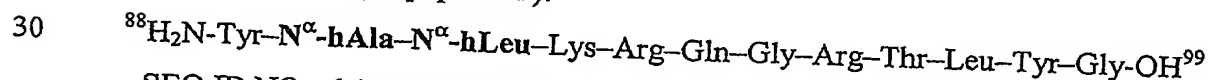
25 - SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



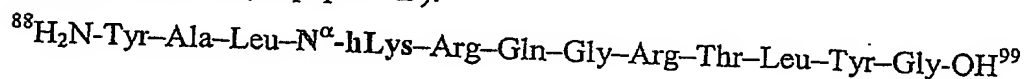
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):

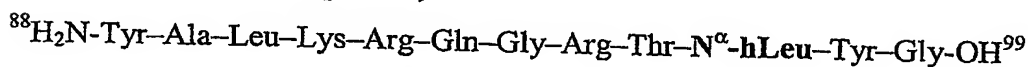


-  $N^{\alpha}haa_m$  et  $N^{\alpha}haa_o$  représentent un résidu monomère aza- $\beta^3$  aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles  $R_1$  est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- $\beta^3$  aminoacyles,

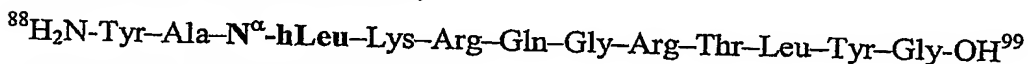
- l, m, n, o, et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4, et l'un au moins de l, n, ou p soit différent de zéro.

8. Peptides hybrides selon la revendication 6 ou 7, de formules suivantes :

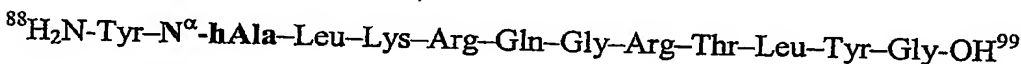
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



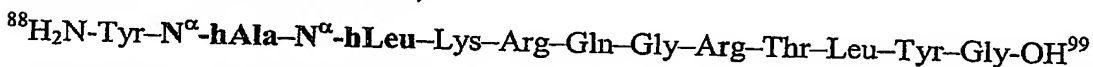
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



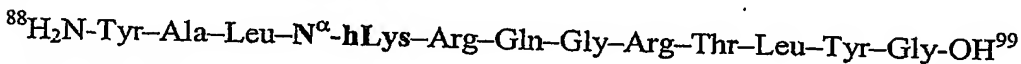
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



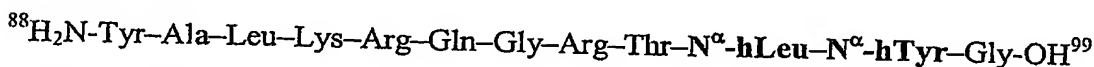
- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



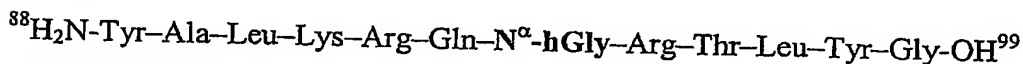
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



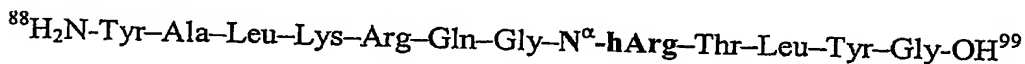
- SEQ ID NO : 7 :



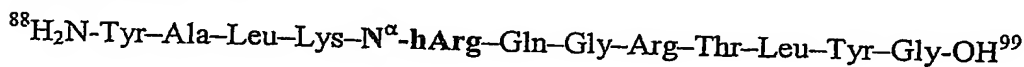
- SEQ ID NO : 8 :



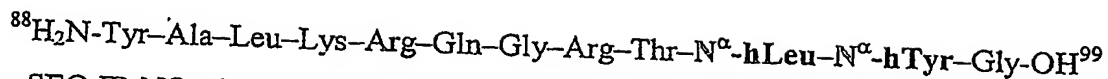
- SEQ ID NO : 9 :



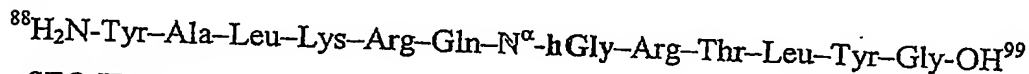
- SEQ ID NO : 10 :



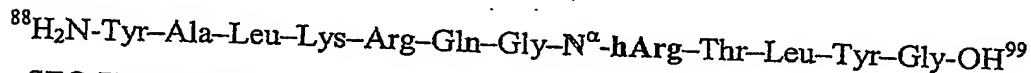
- SEQ ID NO : 7 :



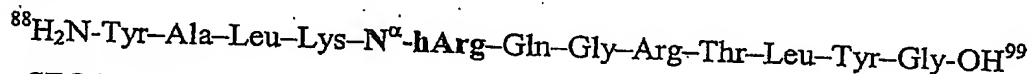
- SEQ ID NO : 8 :



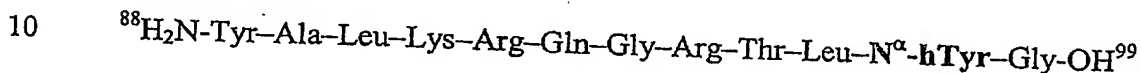
5 - SEQ ID NO : 9 :



- SEQ ID NO : 10 :

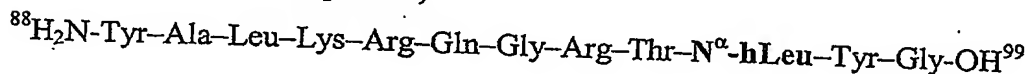


- SEQ ID NO : 11 :



9. Peptide hybride selon l'une des revendications 6 à 8, de formule suivante:

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



15

20 10. Anticorps anti- hybrides polyclonaux ou monoclonaux tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un peptide hybride défini dans l'une des revendications 1 à 9, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces peptides hybrides, et/ou avec les peptides ou protéines parents correspondant à ces derniers, et caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le peptide parent ou la protéine parente avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-peptide parent ou anti-protéine parente vis à vis du peptide parent ou de la protéine parente.

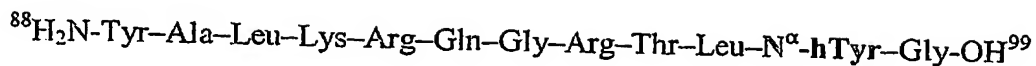
25

11. Anticorps anti-idiotypes susceptibles de former un complexe avec les anticorps selon la revendication 10, tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec lesdits anticorps selon la revendication 10.

30

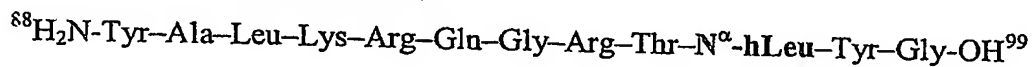
12. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe MHC-hybride), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe MHC-hybride-récepteur T).

- SEQ ID NO : 11 :



9. Peptide hybride selon l'une des revendications 6 à 8, de formule suivante:

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



10. Anticorps anti- peptides hybrides polyclonaux ou monoclonaux tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un peptide hybride défini dans l'une des revendications 1 à 9, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces peptides hybrides, et/ou avec les peptides ou protéines parents correspondant à ces derniers, et caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le peptide parent ou la protéine parente avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-peptide parent ou anti-protéine parente vis à vis du peptide parent ou de la protéine parente.

11. Anticorps anti-idiotypes susceptibles de former un complexe avec les anticorps selon la revendication 10, tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec lesdits anticorps selon la revendication 10.

12. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe MHC-hybride), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe MHC-hybride-récepteur T).

13. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, et un récepteur de cellules T.

14. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur d'anticorps dirigés contre ladite protéine, avec un peptide hybride tel que

13. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, et un récepteur de cellules T.

5 14. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, caractérisée en ce qu'elle comprend:

10 - la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur d'anticorps dirigés contre ladite protéine, avec un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, ledit peptide hybride étant issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou issu d'un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène,

15 dans des conditions permettant la réaction entre les anticorps dirigés contre la protéine et susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique, et le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente ou

20 - la détection *in vitro* d'anticorps circulants chez le patient par un test de compétition en utilisant un anticorps anti-hybride.

25 15. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

30 - la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur de ladite protéine, avec l'un au moins des anticorps selon la revendication 10, les anticorps étant avantageusement dirigés contre un peptide hybride issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou

dans des conditions permettant la réaction entre la protéine susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et les susdits anticorps dirigés contre le susdit peptide hybride;



défini dans l'une des revendications 1 à 9, ledit peptide hybride étant issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou issu d'un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène,

dans des conditions permettant la réaction entre les anticorps dirigés contre la protéine et susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique, et le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente ou

- la détection *in vitro* d'anticorps circulants chez le patient par un test de compétition en utilisant un anticorps anti-hybride.

15. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur de ladite protéine, avec l'un au moins des anticorps selon la revendication 10, les anticorps étant avantageusement dirigés contre un peptide hybride issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou

dans des conditions permettant la réaction entre la protéine susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et les susdits anticorps dirigés contre le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente, ou

- la détection d'antigènes circulants chez le patient dans des tests de compétition en utilisant un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9.

16. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 14 ou 15, comprenant:

- un peptide hybride issu de tout ou partie de la protéine endogène ou exogène, ou correspondant à un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène, ou bien des anticorps selon la revendication 10, dirigés contre ce peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente, ou
- la détection d'antigènes circulants chez le patient dans des tests de compétition en utilisant un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9.

5

16. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 14 ou 15, comprenant:

- un peptide hybride issu de tout ou partie de la protéine endogène ou exogène, ou correspondant à un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène, ou bien des anticorps selon la revendication 10, dirigés contre ce peptide hybride;
- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;
- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

10

15

20

17. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, ou un anti-idiotype selon la revendication 11, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

25

30

18. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, ou un anticorps anti-idiotype selon la revendication 11, associés à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique ou auxiliaire.

19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 10, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

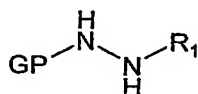
- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

17. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, caractérisée en ce qu'elle comprend un anti-idiotype selon la revendication 11, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

18. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, ou un anticorps anti-idiotype selon la revendication 11, associés à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique ou auxiliaire.

19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 10, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

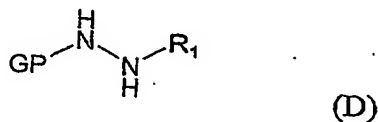
20. Procédé de préparation d'aza- $\beta^3$  aminoacides caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de l'hydrazine substituée et protégée de formule (D) suivante :



(D)

dans laquelle R représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides, le cas échéant protégée, et GP un groupe protecteur des fonctions amines, tels que Boc, Fmoc, ou Z,

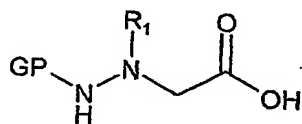
20. Procédé de préparation d'aza- $\beta^3$  aminoacides caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de l'hydrazine substituée et protégée de formule (D) suivante :



dans laquelle R représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides, le cas échéant protégée, et GP un groupe protecteur des fonctions amines, tels que Boc, Fmoc, ou Z,

avec de l'acide glyoxylique sous agitation en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  en milieu acide,

ce qui conduit en une étape au composé aza- $\beta^3$  aminoacide de formule



dans laquelle R et GP sont tels que définis ci-dessus, ledit composé pouvant le cas échéant être déprotégé, notamment à l'aide de  $\text{HCl}$ , de pipéridine, ou d'hydrogène palladié, afin d'éliminer le groupe GP et le remplacer par H.

21. Aza- $\beta^3$  aminoacides de formules suivantes :

Fmoc aza- $\beta^3$ -Glycine ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Gly}-\text{OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Lysine ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Lys}(\text{Boc})-\text{OH}$ ),

Fmoc -aza- $\beta^3$ -Aspartique acide ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Asp}(\text{OtBu})-\text{OH}$ ),

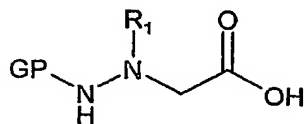
Fmoc aza- $\beta^3$ -Méthionine ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Met}-\text{OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$  Arginine ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Arg}(\text{Boc})-\text{OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Tyrosine ( $\text{Fmoc}-\text{N}^{\alpha\text{H}}\text{Tyr}(\text{OCH}_2\text{OEt})-\text{OH}$ ).

avec de l'acide glyoxylique sous agitation en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  en milieu acide,

ce qui conduit en une étape au composé aza- $\beta^3$  aminoacide de formule



dans laquelle R et GP sont tels que définis ci-dessus, ledit composé pouvant le cas échéant être déprotégé, notamment à l'aide de  $\text{HCl}$ , de pipéridine, ou d'hydrogène palladié, afin d'éliminer le groupe GP et le remplacer par H.

21. Aza- $\beta^3$  aminoacides de formules suivantes :

Fmoc aza- $\beta^3$ -Glycine ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Gly-OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Lysine ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Lys(Boc)-OH}$ ),

Fmoc -aza- $\beta^3$ -Aspartique acide ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Asp(OtBu)-OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Methionine ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Met-OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$  Arginine ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Arg (Boc)-OH}$ ),

Fmoc aza- $\beta^3$ -Tyrosine ( $\text{Fmoc-N}^{\alpha\text{h}}\text{Tyr(OCH}_2\text{OEt)-OH}$ ).

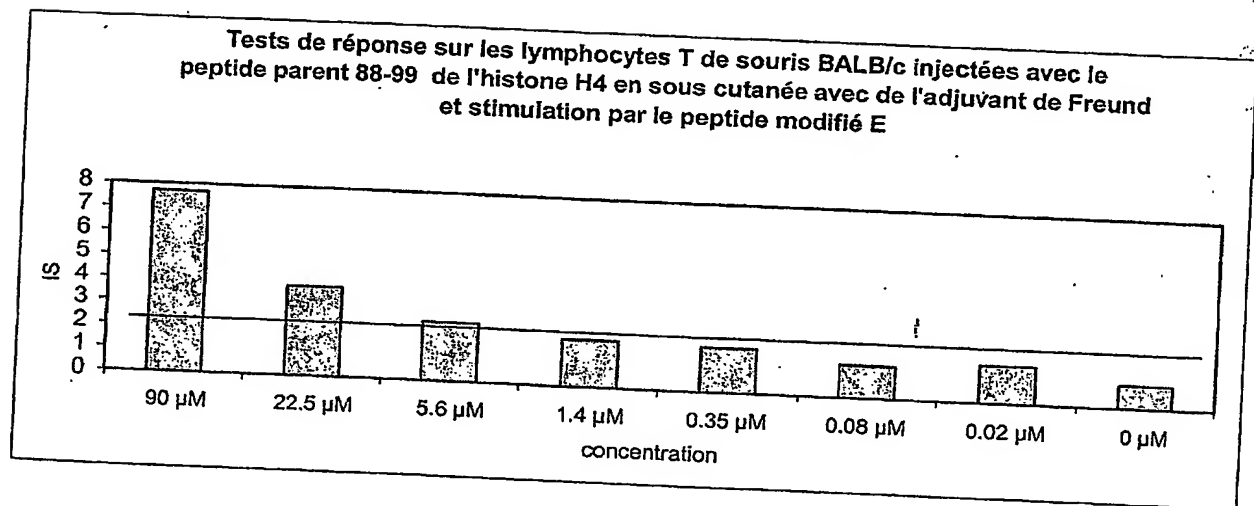
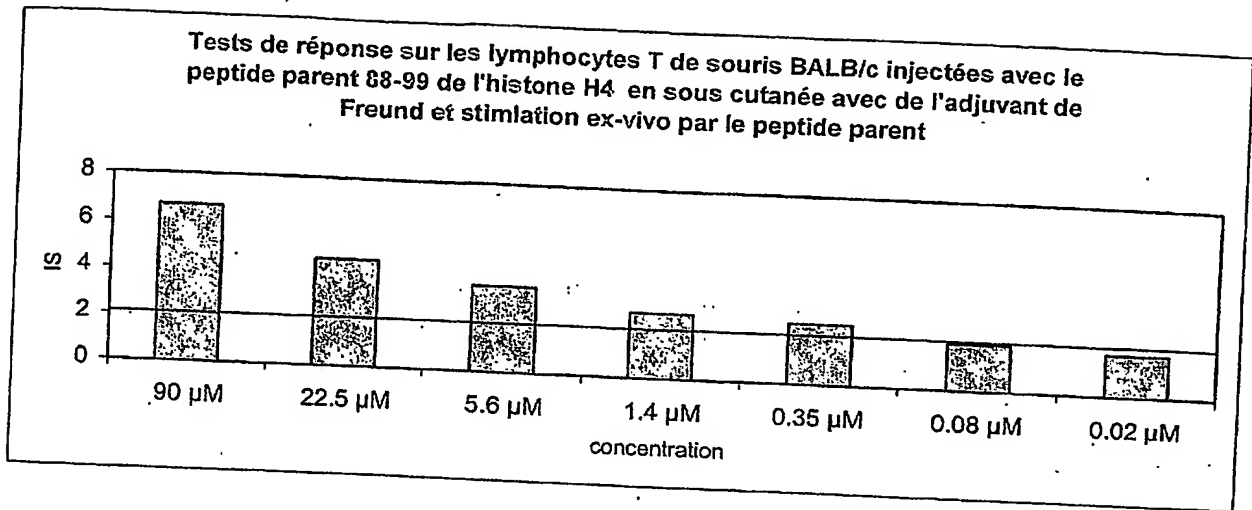


Figure 1

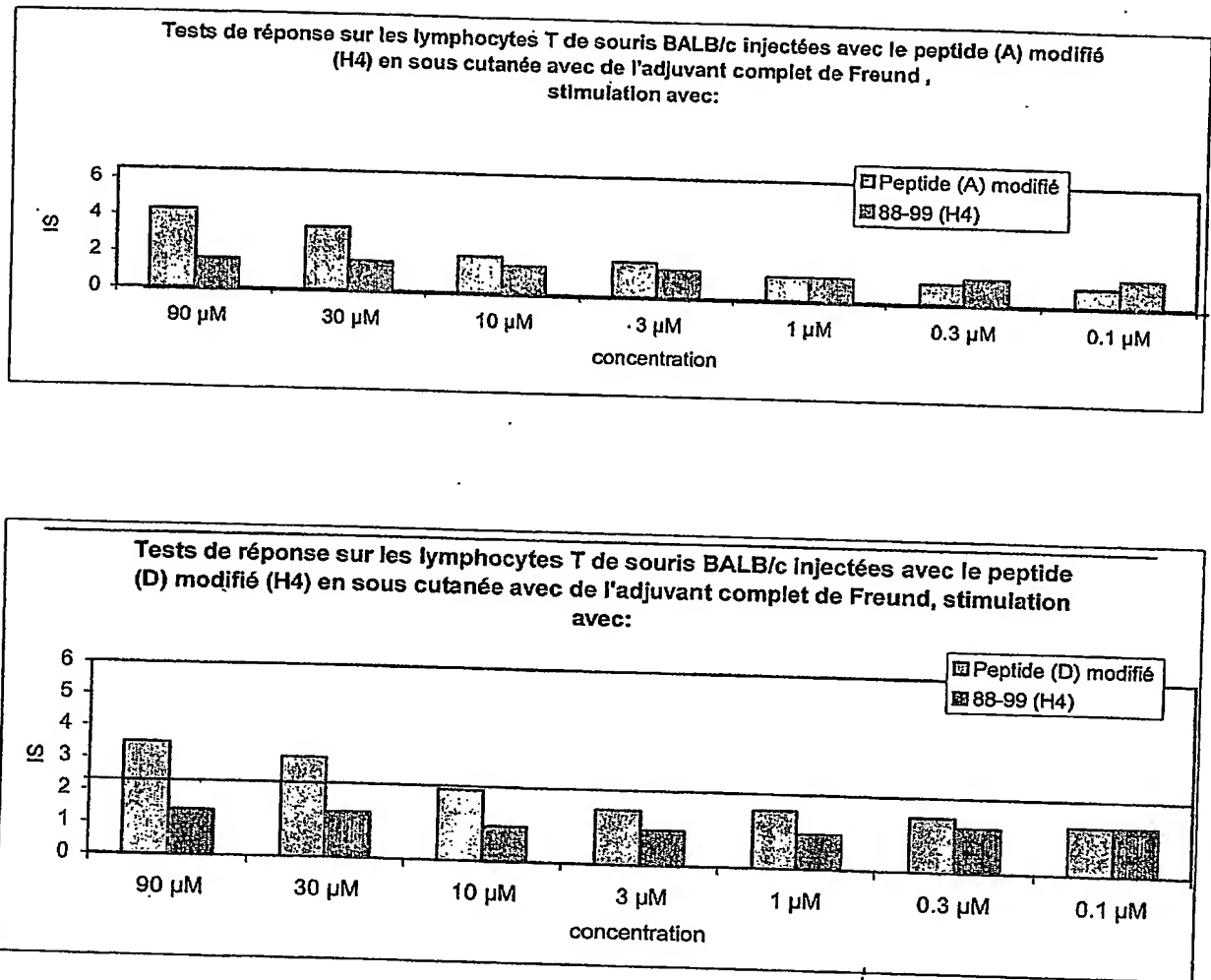


Figure 2

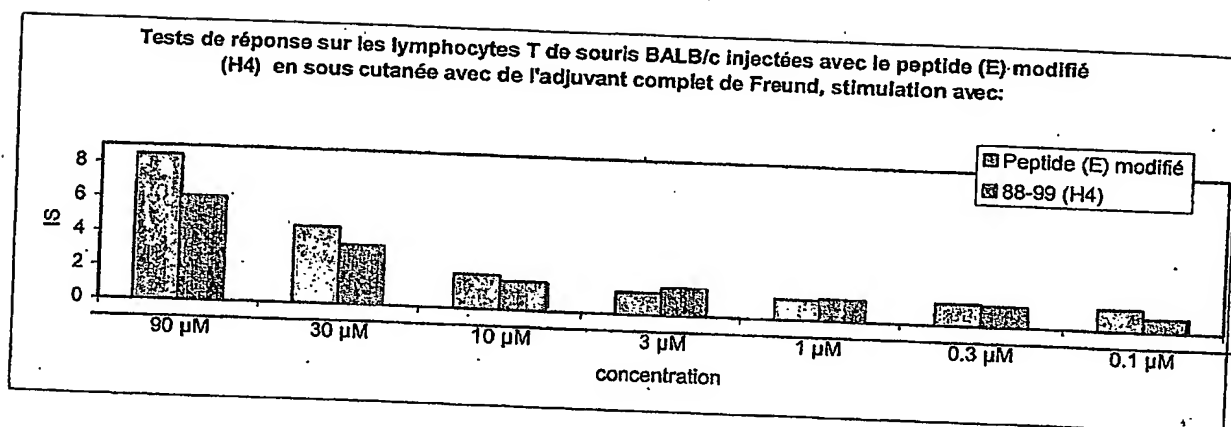


Figure 3



# LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU AZA-BETA3-AMINOACYLE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THERAPIE

<130> IFB 03 AQ CNR AZA3

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Peptide hybride

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Nalpha-hLeucine

<400> 2

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Xaa Tyr Gly  
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Peptide hybride

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Nalpha-hLeucine

<400> 3

Tyr Ala Xaa Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
1 5 10

<210> 4

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Nalpha-hAlanine

<400> 4

Tyr Xaa Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Nalpha-hAlanine

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Nalpha-hLeucine

<400> 5

Tyr Xaa Xaa Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Nalpha-hLysine

<400> 6

Tyr Ala Leu Xaa Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Nalpha-hLeucine

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Nalpha-hTyrosine

<400> 7

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Xaa Xaa Gly  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Nalpha-hGlycine

<400> 8

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Xaa Arg Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Nalpha-hArginine

<400> 9

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Xaa Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Nalpha-hArginine

<400> 10

Tyr Ala Leu Lys Xaa Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Peptide hybride

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Nalpha-hTyrosine

<400> 11

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Xaa Gly  
 1 5 10

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier  
(facultatif)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

IFB 3 AQ CNR AZA3

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

03/06992

ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU AZA- $\beta^3$ -AMINOACYLE,  
ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THERAPIE

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
3, rue Michel-Ange  
F-75794 PARIS CEDEX 16, France, et

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom

Prénoms

BAUDY FLOC'H

Adresse

Rue

Michèle

Code postal et ville

2bis, rue Moreau de Jonnes,

Société d'appartenance (facultatif)

35000 RENNES

Nom

Prénoms

BUSNEL

Adresse

Rue

Olivier

Code postal et ville

La Bourrelière

Société d'appartenance (facultatif)

50140 FONTENAY

Nom

Prénoms

MULLER

Adresse

Rue

Sylviane

Code postal et ville

11, rue Beethoven

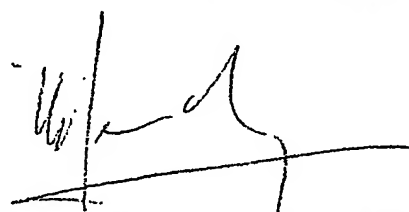
Société d'appartenance (facultatif)

67000 STRASBOURG

DATE ET SIGNATURE(S)  
DU (DES) DEMANDEUR(S)  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 26 novembre 2003

Charles Demachy - Mandataire  
422.5/PP170



PCT/FR2004/001467



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**